

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/065121 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/50**,  
B01L 3/00, B01F 7/16, B01L 3/02, G01N 15/14

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **EVOTEC OAI AG** [DE/DE]; Schnackenburgallee  
114, 22525 Hamburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01544

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:  
14. Februar 2002 (14.02.2002)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KEHLENBECK, Markus** [DE/DE]; Kalberkamp 28, 28844 Weyhe (DE).  
**PUMP, Dennis** [DE/DE]; Vogelweide 25c, 22081  
Hamburg (DE). **WEBER, Dagmar** [DE/DE]; Tein-  
stücken 4k, 22525 Hamburg (DE). **WERNER, Irmgard**  
[DE/DE]; Dammhauser Str. 73h, 21614 Buxtehude (DE).  
**ROTHAUSZKY, Dagmar** [DE/DE]; Melanchthonstr. 35,  
22525 Hamburg (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

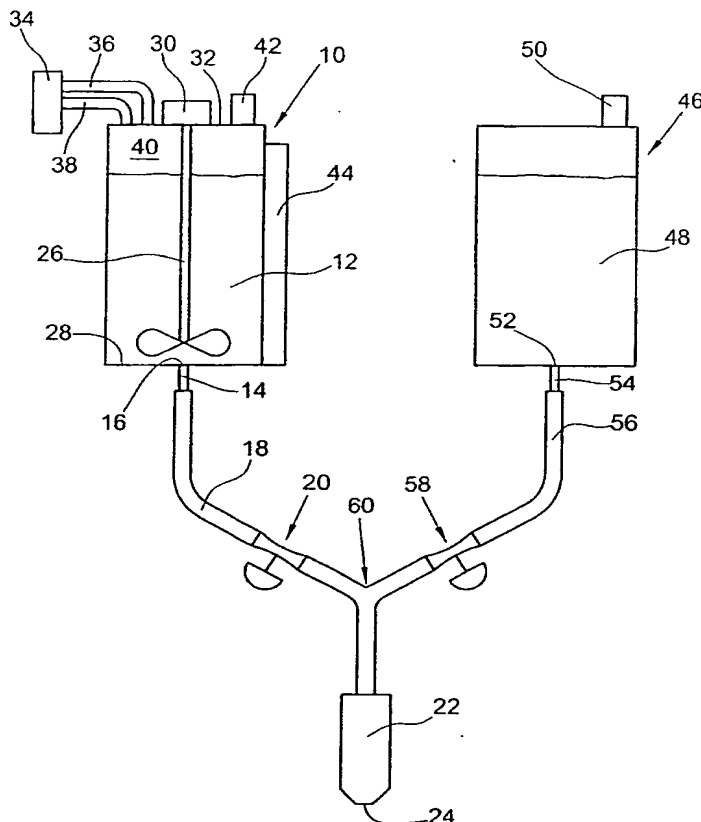
(30) Angaben zur Priorität:  
101 06 713.5 14. Februar 2001 (14.02.2001) DE

(74) Anwälte: **VON KIRSCHBAUM, Alexander** usw.; Post-  
fach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DISPENSING DEVICE

(54) Bezeichnung: DISPENSIONSVORRICHTUNG



(57) Abstract: The invention relates to a dispensing device for dispensing particle suspensions (12), especially cell suspensions, comprising a reservoir (10) for receiving the particle suspension (12). A suspending agent (26) is provided in the reservoir (10) that influences the particle suspension (12). The suspending agent (26) serves to preserve homogenous particle distribution in the particle suspension (12). A microdispenser (22) is connected to the reservoir (10) by a fluid element (18). The microdispenser serves for delivering microdroplets on a titer plate.

(57) Zusammenfassung: Eine Dispensionsvorrichtung zur Dispension von Partikelsuspensionen (12), insbesondere von Zellsuspensionen, weist ein Reservoir (10) zur Aufnahme der Partikelsuspension (12) auf. In dem Reservoir (10) ist ein Suspensionsmittel (26) vorgesehen, das auf die Partikelsuspension (12) einwirkt. Das Suspensionsmittel (26) dient zur Aufrechterhaltung einer homogenen Partikelverteilung in der Partikelsuspension (12). Über ein Fluidelement (18) ist ein Mikrodispenser (22) mit dem Reservoir (10) verbunden. Der Mikrodispenser dient zur Abgabe von Mikrotropfen in einer Titerplatte.

WO 02/065121 A1



(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

### **Dispensionsvorrichtung**

Die Erfindung betrifft eine Dispensionsvorrichtung zur Dispension von Partikelsuspensionen, insbesondere von Zellsuspensionen.

Insbesondere in der Wirkstoffforschung wird heutzutage eine große Anzahl von Wirksubstanzen mit Hilfe von Hochdurchsatz-Screening getestet. Hierbei wird eine große Anzahl von Proben in einem automatisierten Verfahren in kurzer Zeit getestet. Die Wirksubstanzen werden beim Hochdurchsatz-Screening in miniaturisierte Mikrotiterplatten oder andere geeignete Probenträger mit Vertiefungen (Wells) eingebracht. Da die Kosten für die Wirksubstanzen, deren Lagerung in Substanzbibliotheken sowie die Entsorgung der Wirksubstanzen nach dem Testvorgang äußerst kostenintensiv ist, sind die Volumina der einzelnen Wells möglichst klein. Bei modernen Titerplatten sind die Volumina der einzelnen Wells häufig im Mikroliter- und Nanoliterbereich.

Es ist somit erforderlich, Kleinstmengen in die Wells durch Pipettieren oder Dispensieren einzubringen. Eine geeignete Pipettiervorrichtung für Wirksubstanzen ohne empfindliche Partikel ist beispielsweise in WO 96/24040 beschrieben.

Da die Bedeutung der Untersuchung von Partikelsuspensionen, insbesondere von Zellsuspensionen zugenommen hat, ist es erforderlich eine Vorrichtung zu entwickeln, mit der auch Partikelsuspensionen in Kleinstmengen den Wells

- 2 -

zugeführt werden können. Hierbei besteht insbesondere das Problem, dass beispielsweise Zellen und andere mechanisch wenig stabile Partikel beim Zuführen in die Wells leicht beschädigt werden. Insbesondere ist das Pipettieren von flüssigen Proben für Partikelsuspensionen nicht einsetzbar, da die Partikel beispielsweise sowohl beim Einsaugen in die Pipette als auch beim Ausstoßen aus der Pipette die sehr enge Pipettenöffnung passieren müssen. Hierbei ist beispielsweise die Gefahr der Scherung der Zellen sowie die Schädigung der Oberflächenfunktion der Zellen sehr hoch. Die in WO 96/24040 beschriebene Pipetervorrichtung ist daher für Partikelsuspensionen nicht verwendbar.

Aus WO 98/06821 ist ferner ein System zum Dispensieren von Flüssigkeiten bekannt. Hierbei wird je Dispensiervorgang ein einzelner Partikel bzw. eine einzelne Zelle dispensiert. Es handelt sich hierbei um eine äußerst aufwendige und kostenintensive Vorrichtung. Eine derartige Vorrichtung ist für das Hochdurchsatz-Screening insbesondere nicht geeignet, da das Füllen der einzelnen Wells, in welchen eine bestimmte Anzahl an Partikeln bzw. Zellen enthalten sein soll, zu zeitintensiv ist, um beispielsweise bei effektiven Anlagen mehr als 10 000 Tests pro Tag durchführen zu können.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Dispensionsvorrichtung zur Dispension von Partikelsuspensionen, insbesondere von Zellsuspensionen zu schaffen, mit der ein Dispensieren von Kleinstmengen über mehrere Stunden möglich ist.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt erfindungsgemäß durch eine Dispensionsvorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 1.

Die erfindungsgemäße Dispensionsvorrichtung weist ein Reservoir zur Aufnahme einer Partikelsuspension, insbesondere einer Zellsuspension auf. Die Partikelsuspension kann ferner auch synthetische Mikropartikel, wie Beads, insbesondere polymere Beads, aufweisen. Insbesondere beim Dispensieren von Zellen bzw. Partikeln besteht das Problem, dass diese nicht homogen in der

- 3 -

Flüssigkeit verteilt sind und es somit nicht möglich ist, beispielsweise die Wells einer Titerplatte mit einer reproduzierbaren Anzahl an Zellen bzw. Partikeln mit geringer Varianz zu befüllen, da Sedimentationseffekte und dergleichen auftreten, die die Konzentration der Zellen bzw. Partikel lokal in der Suspension verändern. Hierdurch verändert sich die Anzahl der dosierten Zellen bzw. Partikel bei jedem Dosiervorgang derart, dass eine Verfälschung der Messergebnisse erfolgt. Erfindungsgemäß weist die Dispensionsvorrichtung zur Homogenisierung der Partikelverteilung in der Partikelsuspension ein auf die Partikelsuspension einwirkendes Suspensionsmittel auf. Durch das Suspensionsmittel wird ein Mischen der Partikelsuspension erreicht, so dass eine im Wesentlichen homogene Partikelverteilung in der Partikelsuspension erreicht ist. Die Varianz der Anzahl der einzelnen Partikel bzw. Zellen in den Wells ist somit äußerst gering. Insbesondere ist die Varianz zwischen den einzelnen Wells kleiner als 15 %, insbesondere kleiner als 10 %. Eine derart geringe Varianz kann auch bei kontinuierlichem Dispensieren über mehrere Stunden verwirklicht werden. Beispielsweise beträgt die Zellkonzentration in der Suspension zwischen  $1 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml. Hieraus ergibt sich eine Anzahl von 100 - 2.000 Zellen je Well bei einer Füllung von 1  $\mu$ l je Well. Auch bei derart hohen Zellkonzentrationen kann die vorstehend geringe Varianz auf Grund des Vorsehens eines Suspensionsmittels in dem Reservoir erzielt werden.

Ferner weist die Dispensionsvorrichtung einen Mikrodispenser zur Abgabe von Mikrotropfen auf. Die Mikrotropfen, deren Volumen kleiner als 5  $\mu$ l, vorzugsweise kleiner als 100 nl, vorzugsweise kleiner als 10 nl, insbesondere kleiner als 3 nl und besonders bevorzugt kleiner als 0,5 nl ist, werden von dem Mikrodispenser in die Wells oder Vertiefungen eines Probenträgers abgegeben. Hierzu ist der Mikrodispenser über ein Fluidelement mit dem Reservoir zur kontinuierlichen Bereitstellung von Partikelsuspension an dem Mikrodispenser verbunden.

Mit der erfindungsgemäßen Dispensionsvorrichtung ist es aufgrund des Vorsehens eines Suspensionsmittels möglich, eine Partikelsuspension,

insbesondere eine Zellsuspension über mehrere Stunden zu dispensieren, wobei die Anzahl der Partikel bzw. Zellen in den einzelnen Dispensiervorgängen eine geringe Varianz aufweist. Es ist somit mit der erfindungsgemäßen Dispensationsvorrichtung möglich, eine einheitliche und reproduzierbare Zahl an Partikeln bzw. Zellen in Abhängigkeit des abgegebenen Volumens zu erzeugen.

Das Suspensionsmittel ist insbesondere derart ausgebildet, dass beim Mischen der Partikelsuspension im Wesentlichen keine Beschädigung der Partikel, insbesondere der Zellen auftritt.

Hierfür ist beispielsweise ein Stabrührer einsetzbar. Der Stabrührer, bei dem es sich bevorzugt um einen Stabrührer mit dreieckigem Röhrelement handelt, ist beispielsweise mit Hilfe von Magnetkräften über einen unterhalb des Reservoirbodens angeordneten Motor angetrieben. Hierdurch kann eine äußerst effektive Suspendierung in der Partikelsuspension erzielt werden. Da bei einem derartigen Stabrührer jedoch Reibung zwischen dem Röhrelement und dem Reservoirboden auftritt, kann auf Grund des Auftretens von starken Scherkräften eine Zerstörung der Zellen auftreten. Bevorzugt wird daher als Suspensionsmittel ein hängendes Rührsystem, insbesondere ein hängender Stabrührer, eingesetzt. Dieser wird über eine beispielsweise mit dem Deckel des Reservoirs verbundene drehbare Achse möglichst zentriert in dem Reservoir angebracht. Der Antrieb kann über einen mit der Achse verbundenen, außerhalb des Reservoirs angeordneten Motor erfolgen. Ebenso kann der Motor wiederum unterhalb des Reservoirbodens angeordnet sein und den Stabrührer über Magnetkräfte antreiben. Um ein möglichst gutes Antreiben des Rührers mit Hilfe von Magnetkräften zu ermöglichen, weist der Rührer vorzugsweise Seltene-Erden-Metalle auf. Auf Grund des Vorsehens von Seltene-Erden-Metallen ist es möglich, den Rührer auch durch dicke Reservoirwände, insbesondere dicke Reservoirböden, anzutreiben. Ein frei in der Partikelsuspension hängender Stabrührer hat den Vorteil, dass beim Rühren keine Berührung des Stabrührers mit dem Reservoirboden oder einer Reservoirwand stattfindet. Hierdurch sind die

- 5 -

mechanischen Belastungen für die Zellen oder andere in der Partikelsuspension enthaltenen Partikel bei Erzielen einer guten Homogenität innerhalb der Partikelsuspension minimiert.

Der vorzugsweise verwendete Rührer weist mindestens drei, vorzugsweise mindestens vier Rührblätter auf. Diese sind insbesondere regelmäßig am Umfang des Rührers angeordnet. Die einzelnen Rührblätter weisen vorzugsweise zur Längsachse des Rührers einen Winkel von 50 bis 85°, besonders bevorzugt 60 bis 70°, auf. Hierbei ist der Winkel derart bestimmt, dass die Rührblätter gegenüber einer bei einem vertikal angeordneten Rührer horizontalen Ebene einen Winkel von 40 bis 5° bzw. 30 bis 20° aufweisen. Bezüglich dieser horizontalen Ebene ist die Neigung der Rührblätter somit relativ flach. Dies hat den Vorteil, dass die Stoßkraft zwischen Partikeln in der Partikelsuspension und den Rührblättern reduziert ist. Eine maximale Stoßkraft würde auftreten, wenn die Rührblätter parallel zur Längsachse angeordnet wären. Die Rührblätter sind vorzugsweise an den Kanten abgerundet.

Zur weiteren Verringerung der Stoßkräfte zwischen den Partikeln und den Rührblättern sind Mischflächen der Rührblätter leicht konvex ausgebildet. Unter Mischflächen werden hierbei diejenigen Flächen der Rührblätter verstanden, gegen die die Partikel beim Mischen prallen.

Vorzugsweise ist der Rührer aus inerten, biokompatiblen Materialien hergestellt oder mit derartigen Materialien beschichtet. Vorzugsweise weist der Rührer eine PTFE-Beschichtung auf. Des weiteren ist die Oberfläche der Rührblätter vorzugsweise möglichst glatt ausgebildet, um ein Beschädigen der Partikel zu vermeiden.

Insbesondere bei der Dispersion von Zellsuspensionen über mehrere Stunden ist die Gasversorgung der Zellen, insbesondere mit Sauerstoff und Kohlendioxid kritisch. Des weiteren dient die Zufuhr von Kohlendioxid der pH-Regulierung der

- 6 -

Flüssigkeit. Bei einer bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Dispensionsvorrichtung zusätzlich zu dem Suspensionsmittel, durch das die Gasversorgung der Zellen oder Partikel bereits unterstützt wird, eine Gasversorgungseinrichtung auf. Hierzu ist das Reservoir beispielsweise über eine Gaszuleitung mit der Gasversorgungseinrichtung verbunden. Diese ist vorzugsweise regelbar, so dass beispielsweise in Abhängigkeit der Partikelart Gas dem Reservoir zugeführt werden kann. Hierzu ist das Reservoir vorzugsweise derart ausgebildet, dass es nicht vollständig mit der Partikelsuspension befüllt ist und sich ein Gasraum im oberen Bereich des Reservoirs bildet.

Zur besseren Versorgung der Partikel, insbesondere der Zellen mit Sauerstoff, Kohlendioxid oder anderen Gasen kann das Gas auch in die Flüssigkeit eingeleitet werden, so dass es in Blasenform in der Flüssigkeit nach oben steigt und hierbei eine Versorgung der Partikel gewährleistet. Es wurde festgestellt, dass das Einleiten von Gasen in die Flüssigkeit jedoch den Nachteil aufweist, dass es insbesondere bei Zellsuspensionen durch die aufsteigenden und ggf. platzenden Gasblasen zu Scherungen der Zellen kommen kann. Vorzugsweise wird bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung das zur Versorgung der Partikel, insbesondere der Zellen, erforderliche Gas nicht unmittelbar in die Partikelsuspension, sondern nur in das Reservoir eingeleitet, so dass die entsprechenden Gase in den Raum zwischen Flüssigkeitsoberfläche und Deckel eingeleitet werden. Auf Grund der durch das Suspensionsmittel hervorgerufenen Bewegung der Partikelsuspension erfolgt eine ausreichende Aufnahme der erforderlichen Gase in die Suspension.

Um das Dispensieren einer Partikelsuspension über mehrere Stunden zu gewährleisten weist das Reservoir vorzugsweise ein Volumen von 1 - 500 ml auf, wobei die Größe des Reservoirs an die Volumina der beispielsweise in Titerplatten vorgesehenen Wells angepasst ist.

Der zur Dispension der Partikelsuspension vorgesehene Mikrodispenser ist vorzugsweise piezoelektrisch aktiviert. Dies hat den Vorteil, dass sehr kleine



- 7 -

Mikrotropfen erzeugt werden können, deren Volumen kleiner als 10 nl, insbesondere kleiner als 3 nl und besonders bevorzugt kleiner als 0,5 nl, ist. Ferner kann der Mikrodispenser derartig aufgebaut sein, dass ein Piezoelement auf einen flexiblen Kanal einwirkt, wobei der Kanal ein vorzugsweise in sich geschlossener runder Schlauch oder dergleichen ist. Dies hat den Vorteil, dass der Mikrodispenser auf einfache Weise gereinigt und damit steril gehalten werden kann.

Bei dem Mikrodispenser handelt es sich beispielsweise um eine Glas-Silizium-Struktur, in der eine Pumpkammer vorgesehen ist. Die Pumpkammer weist eine elastische Kammerwand auf, die mit einem elektrisch ansteuerbaren Aktuator zur Erzeugung von Druck in der Pumpkammer bzw. zur Verringerung des Kammervolumens verbunden ist. Durch die Ansteuerung des Aktuators wird von dem Mikrodispenser ein Tropfen abgegeben. Die Pumpkammer ist vorzugsweise durch eine Einlaßöffnung und eine Auslaßöffnung, die die Auslaßöffnung des Mikrodispensers bildet oder mit dieser verbunden ist, begrenzt. Die Einlaßöffnung ist über ein Fluidelement, wie ein Schlauch, mit dem Reservoir verbunden. Durch das Vorsehen einer Einlaßöffnung ist vermieden, dass der von dem Aktuator in der Pumpkammer erzeugte Druck eine Flüssigkeitsverdrängung in Richtung des Reservoirs anstelle in Richtung der Auslaßöffnung erzeugt. Über die Einlaßöffnung ist ein kontinuierlicher Zulauf der zu dispensierenden Flüssigkeit gewährleistet. Die Pumpkammer weist vorzugsweise ein Volumen zwischen 100 nl und 5 ml, vorzugsweise zwischen 100 nl und 10 µl, insbesondere zwischen 500 nl und 2 µl, auf. Die Düsenweite der Auslaßöffnung ist vorzugsweise kleiner als 500 µm, vorzugsweise kleiner als 200 µm, insbesondere kleiner als 100 µm. Somit kann bei der bevorzugten Dispensiervorrichtung eine Tropfengröße erzeugt werden, deren Volumen kleiner als 10 nl, insbesondere kleiner als 3 nl und besonders bevorzugt kleiner als 0,5 nl ist.

Als Mikrodispenser kann ferner auch eine mit einem Kolben versehene Dispensiereinheit mit Ventil und Düse o.dgl. vorgesehen sein. Durch entsprechendes Ansteuern von Kolben und Ventil ist es ebenfalls möglich, sehr kleine Tröpfchen zu erzeugen. Der Kolbenraum, der der vorstehenden Pumpkammer entspricht, weist hierbei ebenfalls die vorstehend beschriebenen Abmessungen auf, so dass auch entsprechende Tropfengrößen erzielt werden können.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das zwischen dem Reservoir und dem Mikrodispenser angeordnete Fluidelement mit einer Absperreinheit versehen. Die Absperreinheit dient zur Unterbrechung der Zufuhr der Partikelsuspension zum Mikrodispenser. Es ist hierdurch möglich den Mikrodispenser zu reinigen. Eine Reinigung erfolgt beispielsweise in festen zeitlichen Abständen. Vorzugsweise handelt es sich bei der Absperreinheit um ein nicht unmittelbar in das fluide System eingreifendes Bauteil. Dies hat den Vorteil, dass die bei der Handhabung von Partikelsuspensionen erforderlichen Sterilitätsanforderungen gewährleistet sind. Das Vorsehen einer berührungsfreien Absperreinheit hat ferner den Vorteil, dass es biokompatibel ist. Dies bedeutet, dass kein Ventilmaterial, insbesondere keine Metallteile, beispielsweise mit der Zellsuspension in Berührung kommen und diese beeinträchtigen können. Insbesondere eignet sich als Absperreinheit ein Schlauchquetschventil.

Um die Reinigung des Mikrodispensers zu erleichtern, ist der Mikrodispenser vorzugsweise über ein zweites Fluidelement mit einem Vorratsbehälter verbunden, in dem Spülflüssigkeit vorgesehen ist. Es ist somit möglich eine automatische Reinigung des Mikrodispensers durchzuführen. Hierzu ist vorzugsweise mit dem zweiten Fluidelement eine zweite Absperreinheit verbunden, die entsprechend der vorstehend beschriebenen ersten Absperreinheit aufgebaut sein kann. Ebenso ist es möglich, ein herkömmliches Ventil in der zweiten Fluideinheit oder am Auslass des Vorratsbehälters für die Spülflüssigkeit vorzusehen,

da bei der Spülflüssigkeit geringere Sterilitätsanforderungen eingehalten werden müssen.

Vorzugsweise unterscheiden sich die Innendurchmesser der Fluidelemente und der Absperreinheiten nicht oder nur geringfügig. Hierdurch ist ein Sedimentieren der Partikel und damit ein Endhomogenisieren der Partikelsuspension vermieden. Die Durchmesser des gesamten Fluidsystems, die sich vorzugsweise nicht oder nur geringfügig voneinander unterscheiden, liegen vorzugsweise zwischen 5 mm und 500 µm. Besonders bevorzugt sind Durchmesser von 1,5 mm und 200 µm.

Vorzugsweise sind die Durchmesser der einzelnen in der Vorrichtung vorhandenen Kanäle, insbesondere in Abhängigkeit der abgegebenen Flüssigkeitsmenge, derart gewählt, dass die Aufenthaltszeit der Partikelsuspension, insbesondere Zellsuspension, im System kleiner als 10 min., kleiner als 5 min., insbesondere kleiner als 2 min., ist. Hierdurch sind Sedimentationseffekte in dem System im Wesentlichen vermieden. Diese Aufenthaltszeiten gelten selbstverständlich nicht für das Reservoir, in dem die Sedimentation durch das erfindungsgemäße Vorsehen eines Suspensionsmittels vermieden ist.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand einer bevorzugten Ausführungsform unter Bezugnahme auf die anliegende Zeichnung näher erläutert.

Es zeigt:

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Ausführungsform der Dispensionsvorrichtung.

Die Dispensionsvorrichtung weist ein Reservoir 10 auf, in dem die Partikelsuspension 12 aufgenommen ist. Das Reservoir 10 weist einen mit einem Auslassstutzen 14 versehenen Auslass 16 auf. Mit dem Auslassstutzen 14 ist als

- 10 -

Fluidelement ein Schlauch 18 verbunden. Dieser ist unter Zwischenschaltung eines Schlauchquetschventils 20 mit einem Mikrodispenser 22 verbunden.

Der Innendurchmesser des Schlauchs 18 sowie des Auslassstutzens 14 ist vorzugsweise im Wesentlichen identisch. Es handelt sich somit um ein todvolumenfreies Kontaktelement. Eine entsprechende Verbindung besteht auch zu dem Schlauchquetschventil 20. Durch im Wesentlichen konstante Innendurchmesser der Fluidelemente ist das Auftreten von Restriktionsbereichen verhindert, die einen fluidischen Widerstand für die Partikel der Suspension darstellen. Hierdurch würden Scherungen sowie eine zeitliche Veränderung der Anzahl der in der Partikelsuspension transportierten Partikel auftreten. Dies würde zum sogenannten Keystone-Effekt führen, der eine unreproduzierbare Anzahl von Zellen bzw. Partikeln in den Wells hervorruft.

Der Mikrodispenser 22 weist eine Auslassöffnung 24 auf, aus der die Mikrotropfen zum Befüllen von Wells einer Titerplatte ausgestoßen werden.

Das Reservoir 10 weist als Suspensionsmittel einen Stabrührer 26 auf, durch den die Partikelverteilung in der Partikelsuspension 12 über einen längeren Zeitraum von vorzugsweise mehr als 6 Stunden, besonders bevorzugt mehr als 10 Stunden homogen gehalten wird.

Anstelle des in dem Ausführungsbeispiel dargestellten hängenden Stabrührers 26 ist es auch möglich, mehrere Suspensionsmittel vorzusehen. Diese sind vorzugsweise ebenfalls im Inneren des Reservoirs 10 angeordnet und liegen dort entweder auf einem Reservoirboden 28 auf oder sind hängend innerhalb der Partikelsuspension 12 angeordnet. Der Antrieb der Suspensionsmittel kann, wie im dargestellten Ausführungsbeispiel bei dem Stabrührer 26, mittels eines Motors 30 erfolgen. Der Motor 30 ist außerhalb des Reservoirs 10 angeordnet. Bei dem dargestellten Ausführungsbeispiel ist der Motor 30 außen auf einem Deckel 32

- 11 -

des Reservoirs 10 angeordnet. Ebenso ist es möglich, die Suspensionsmittel, beispielsweise berührungslos über eine magnetische Aktuierung anzutreiben.

Eine weitere Möglichkeit zur Durchmischung der Partikelsuspension und damit zur Aufrechterhaltung einer homogenen Partikelverteilung besteht darin, eine Strömung in dem Reservoir 10 zu erzeugen. Dies kann beispielsweise durch das Vorsehen von Umwälzpumpen hervorgerufen werden. Vorzugsweise sind hierfür zwei Reservoirre vorgesehen, zwischen denen die Partikelsuspension mit Hilfe einer Umwälzpumpe bewegt wird.

Zur Versorgung der Partikelsuspension 12, insbesondere der Zellsuspension ist das Reservoir 10 mit einer Gasversorgungseinrichtung 34 verbunden. Mit Hilfe der Gasversorgungseinrichtung 34 wird über Leitungen 36, 38 Gas, beispielsweise Sauerstoff oder Kohlendioxid in einen Gasraum 40 geleitet. Der Gasraum 40 befindet sich innerhalb des Reservoirs 10 und ist oberhalb der Partikelsuspension 12 vorgesehen. Zur Regelung der in dem Gasraum 40 vorhandenen Gasmenge sowie der unterschiedlichen Gasbestandteile weist die Gasversorgungseinrichtung 34 eine entsprechende Steuerung auf. Ferner ist an dem Deckel 32 ein Druckregler 42 angeordnet, um den Gasdruck in dem Gasraum 40 zu messen und über die Gasversorgungseinrichtung 34 zu regeln.

Zur Temperierung der Partikelsuspension ist vorzugsweise ein Temperierelement 44 vorgesehen, das in dem dargestellten Ausführungsbeispiel an einer Außenwand des Reservoirs 10 angeordnet ist. Das Temperierelement 44 dient zum Erwärmen und/ oder Kühlen der Partikelsuspension 12.

Ferner weist die erfindungsgemäße Dispensionsvorrichtung in dem dargestellten Ausführungsbeispiel einen Vorratsbehälter 46 auf, in dem eine Spülflüssigkeit 48 vorhanden ist. Der Vorratsbehälter 46 ist zur Druckregulierung ebenfalls mit einem Druckregler 50 verbunden. Der Druckregler 50 ermöglicht das Erzeugen eines Unterdruckes oder Überdruckes im Vorratsbehälter 46.

- 12 -

Ein Auslass 52 des Vorratsbehälters 46 ist mit einem Auslassstutzen 54 versehen, der mit einem Schlauch 56 verbunden ist. Der Schlauch 56 ist über ein zweites Schlauchquetschventil 58 ebenfalls mit dem Mikrodispenser 22 verbunden. Im dargestellten Ausführungsbeispiel erfolgt die Verbindung über ein Y-Schlauchverbindungsteil 60, so dass die beiden Schläuche 18, 56 vor dem Mikrodispenser 22 zusammengeführt sind und mit dem Mikrodispenser 22 nur ein Schlauch verbunden ist.

**Patentansprüche**

1. Dispensionsvorrichtung zur Dispension von Partikelsuspensionen (12), insbesondere von Zellsuspensionen, mit  
  
einem Reservoir (10) zur Aufnahme der Partikelsuspension (12),  
  
einem auf die Partikelsuspension (12) einwirkenden Suspensionsmittel (26) zur Aufrechterhaltung einer im Wesentlichen homogenen Partikelverteilung in der Partikelsuspension (12),  
  
einem Mikrodispenser (22) zur Abgabe von Mikrotropfen, deren Volumen kleiner als 5 µl ist, und  
  
einem das Reservoir (10) mit dem Mikrodispenser (22) verbindenden Fluidelement (18) zur kontinuierlichen Bereitstellung von Partikelsuspension (12) an dem Mikrodispenser (22).
2. Dispensionsvorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Suspensionsmittel (26) derart ausgebildet ist, dass im Wesentlichen keine Beschädigung der Partikel, insbesondere der Zellen auftritt.
3. Dispensionsvorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Suspensionsmittel (26) als Rührer mit mindestens drei, vorzugsweise mindestens vier Rührblättern ausgebildet ist.
4. Dispensionsvorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Rührblätter gegenüber einer Längsachse des Rührers (26) einen Winkel von 50 bis 85°, vorzugsweise 60 bis 70°, einschließen.

- 14 -

5. Dispensationsvorrichtung nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Rührblätter Mischflächen aufweisen, die leicht konkav ausgebildet sind.
6. Dispensationsvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass das Reservoir (10) mit einer Gasversorgungseinrichtung zur Versorgung der Partikelsuspensionen mit Gas verbunden ist.
7. Dispensationsvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikrodispenser (22) piezoelektrisch aktiviert ist.
8. Dispensationsvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikrodispenser eine Pumpkammer aufweist, deren Volumen zwischen 100 nl und 5 ml, vorzugsweise zwischen 100 nl und 10  $\mu$ l, besonders bevorzugt zwischen 500 nl und 2  $\mu$ l beträgt.
9. Dispensationsvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikrodispenser eine Dispensieröffnung (24) aufweist, deren Durchmesser kleiner als 500  $\mu$ m, insbesondere kleiner als 200  $\mu$ m und besonders bevorzugt kleiner als 100  $\mu$ m ist.
10. Dispensationsvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass mit dem Fluidelement (18) eine Absperreinheit (20) verbunden ist, um die Zufuhr von Partikelsuspension (12) zum Mikrodispenser (22) zu unterbrechen.
11. Dispensationsvorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Absperreinheit als Schlauchquetschventil (20) ausgebildet ist.
12. Dispensationsvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikrodispenser (22) über ein zweites Fluidelement



- 15 -

(56) mit einem Vorratsbehälter (46) für Spülflüssigkeit (48) zum Reinigen des Mikrodispensers (22) verbunden ist.

13. Dispensationsvorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das zweite Fluidelement (56) mit einer Absperreinheit (58) verbunden ist.

- 1/1 -

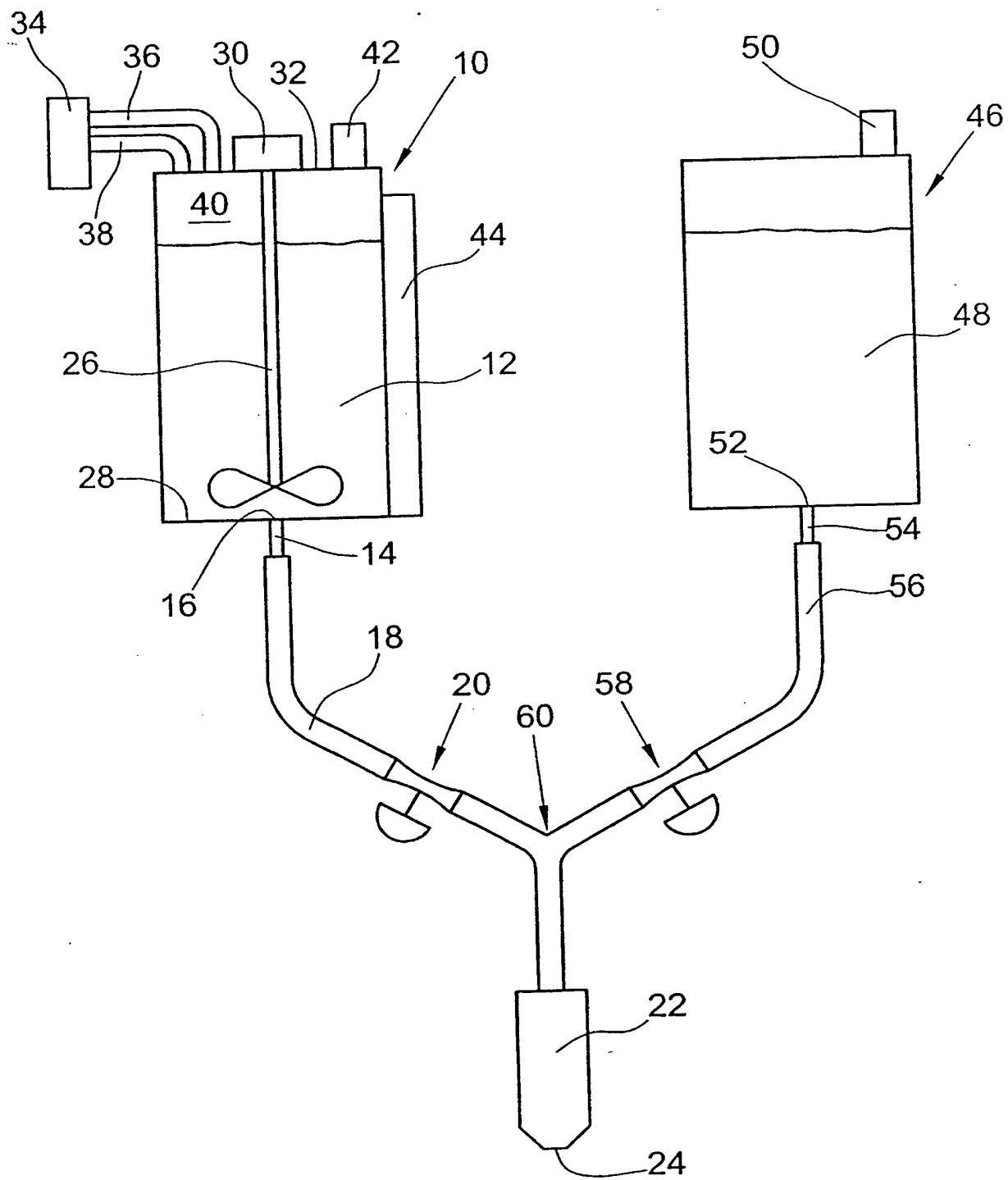


Fig.1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01544

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/50 B01L3/00 B01F7/16 B01L3/02 G01N15/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B01L B01F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 110 167 A (MELNYK JOHN) 29 August 1978 (1978-08-29) column 2, line 26 -column 3, line 7 ---	1-13
A	WO 00 14534 A (BIOCRYSTAL LTD) 16 March 2000 (2000-03-16) page 15, line 30 -page 18, line 20 ---	1-13
X	EP 0 024 230 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 25 February 1981 (1981-02-25) page 3, line 20 -page 4, line 36; figure 1 ---	1
A	EP 0 119 573 A (MILES LAB) 26 September 1984 (1984-09-26) abstract; figure 1 --- -/-	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 2002

Date of mailing of the international search report

01/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tragoustis, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01544

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 92 18608 A (AMERSHAM INT PLC) 29 October 1992 (1992-10-29) page 11, line 30 -page 13, line 26 -----	1-13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/01544

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4110167	A	29-08-1978	NONE	
WO 0014534	A	16-03-2000	AU WO	27-03-2000 16-03-2000
EP 0024230	A	25-02-1981	FR EP	27-02-1981 25-02-1981
EP 0119573	A	26-09-1984	AU EP JP	27-09-1984 26-09-1984 25-10-1984
WO 9218608	A	29-10-1992	DE DE EP WO JP US	11-09-1997 18-12-1997 02-02-1994 29-10-1992 27-10-1994 09-06-1998

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

### Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/01544

### A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/50 B01L3/00 B01F7/16 B01L3/02 G01N15/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7      G01N      B01L      B01F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal

### C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	--	--------------------

A US 4 110 167 A (MELNYK JOHN)  
29. August 1978 (1978-08-29)  
Spalte 2, Zeile 26 -Spalte 3, Zeile 7

1-13

A WO 00 14534 A (BIOCRYSTAL LTD)  
16. März 2000 (2000-03-16)  
Seite 15, Zeile 30 -Seite 18, Zeile 20

1-13

X EP 0 024 230 A (COMMISSARIAT ENERGIE  
ATOMIQUE) 25. Februar 1981 (1981-02-25)  
Seite 3, Zeile 20 -Seite 4, Zeile 36;  
Abbildung 1

1

A EP 0 119 573 A (MILES LAB)  
26. September 1984 (1984-09-26)  
Zusammenfassung; Abbildung 1

1-13

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

**Y** Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

**\*A\*** Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\* **L** Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie auszuführen)

\*O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist.

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nachlegend ist

\*8\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Juni 2002

**Absendedatum des internationalen Recherchenberichts**

01/07/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Tragoustis, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/01544

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 92 18608 A (AMERSHAM INT PLC)  29. Oktober 1992 (1992-10-29)  Seite 11, Zeile 30 -Seite 13, Zeile 26  -----</p>	1-13

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/01544

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4110167	A	29-08-1978	KEINE
WO 0014534	A	16-03-2000	AU 5812899 A WO 0014534 A1
EP 0024230	A	25-02-1981	FR 2463920 A1 EP 0024230 A1
EP 0119573	A	26-09-1984	AU 2519184 A EP 0119573 A1 JP 59188539 A
WO 9218608	A	29-10-1992	DE 69221479 D1 DE 69221479 T2 EP 0580674 A1 WO 9218608 A1 JP 6509463 T US 5763170 A